

10.02.00

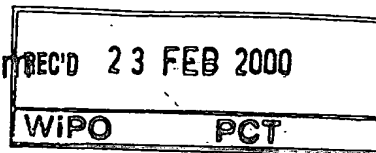
#3
T/NL 99 / 00806

KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 24 december 1998 onder nummer 1010893,
ten name van:

GLAXOWELLCOME B.V.

te Zeist

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Antigeen van een fagocyt, een fagocyt-herkennend agens, en een werkwijze voor het detecteren
van een gepreactiveerde fagocyt",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 10 februari 2000.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

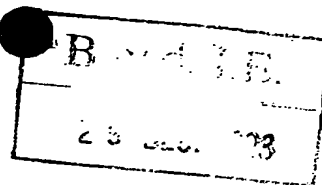
A.W. van der Kruk.

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

10 10 893

UITTREKSEL



De uitvinding heeft betrekking op een antigeen van
5 een fagocyt. Het antigeen volgens de uitvinding is specifiek
voor een gepreactiveerde fagocyt en kan worden herkend door
ten minste één bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd
uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en CBS 101482.
De uitvinding heeft tevens betrekking op een fagocyt-herken-
10 nend agens dat het voor een gepreactiveerde fagocyt specifie-
ke antigeen herkent, alsmede een farmaceutisch preparaat dat
een dergelijk agens bevat. Tenslotte heeft de uitvinding
betrekking op een werkwijze voor het detecteren van een
gepreactiveerde fagocyt onder gebruikmaking van een fagocyt-
15 herkenkend agens volgens de uitvinding.

29 DEC. 1998

NL 43615-A1/lm/ho

Antigeen van een fagocyt, een fagocyt-herkennend agens, en een werkwijze voor het detecteren van een gepreactiveerde fagocyt

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een antigeen van een fagocyt.

Chronische ontstekingsziekten, zoals bijvoorbeeld allergische astma en reumatoïde arthritis, worden gemedieerd door ontstekingscellen zoals T-cellen en fagocyten. Op de plaats van een ontsteking in een orgaan worden cytokinen gevormd. Een deel van de cytokinen diffundeert naar het perifere bloed waar ze betrokken zijn bij de mobilisatie van nieuwe ontstekingscellen. Deze ontstekingscellen worden door interactie met een cytokine gepreactiveerd. De mate van preactivatie van fagocyten correleert met de hoeveelheid ontsteking bevorderende cytokinen en daarmee met de uitgebreidheid van de ontstekingsreactie. Met name voor ziekten gelocaliseerd in organen zoals de long en darm (bijvoorbeeld bij de ziekte van Crohn) is het fysiek zeer lastig of onmogelijk om zonder invasief onderzoek de ernst van een ontsteking betrouwbaar vast te stellen. Daarenboven geeft invasief onderzoek in de vorm van een biopsie alleen informatie over de stand van zaken in het biopsie zelf. Het betrouwbaar vaststellen van de ernst van een ontsteking is met name daarom lastig aangezien tot op heden geen voor een gepreactiveerde fagocyt specifiek antigeen is gevonden.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een antigeen van een fagocyt, waarbij het antigeen kan worden herkend door ten minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482.

Gevonden is dat het aldus gekarakteriseerde antigeen, dat aanwezig is op het oppervlak van een fagocyt, specifiek is voor een gepreactiveerde fagocyt. Door het vaststellen van de aanwezigheid van het antigeen en in het bijzonder de hoeveelheid daarvan kan de aanwezigheid van een ontsteking en de ernst daarvan worden vastgesteld. Ten minste ten dele gezuiverd antigeen, of fragmenten daarvan, kan wor-

den gebruikt voor het verkrijgen van gepreactiveerde fagocytherkennende agentia.

De uitvinding heeft tevens betrekking op een fagocytherkennend agens dat het antigeen herkent dat door ten minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482 wordt herkend.

Een dergelijk agens, bijvoorbeeld een (monoclonaal) antilichaam, is zeer bruikbaar voor het vaststellen van de aanwezigheid van een (orgaangebonden) ontsteking en de ernst daarvan. Daarenboven kan het agens worden gebruikt voor het elimineren van gepreactiveerde fagocyten uit bloed, bijvoorbeeld door middel van aan een drager gebonden agens waarbij na contact tussen drager en bloed deze van elkaar worden gescheiden.

In plaats daarvan kan ook worden gekozen voor het combineren van het agens met een groep die de fagocyt deactiveert of doodt. Hierbij kan worden gedacht aan een antilichaam voorzien van een celdodende eenheid, zoals een RicineB-keten, of aan een bi-specifiek antilichaam dat het immuunsysteem ertoe aanzet de gepreactiveerde fagocyt te elimineren.

De uitvinding heeft derhalve verder betrekking op een farmaceutisch preparaat dat een fagocytherkennend agens bevat tezamen met een farmaceutisch aanvaardbare vulstof of drager.

In het licht van de eerstgenoemde toepassing, het vaststellen van een ontsteking, heeft de uitvinding tevens betrekking op een werkwijze voor het detecteren van een gepreactiveerde fagocyt, waarmee een gepreactiveerde fagocyt specifiek kan worden gedetecteerd.

Hiertoe wordt de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding gekenmerkt doordat een fagocytherkennend agens in contact wordt gebracht met een fagocyt, en een tussen het fagocytherkennende agens en de fagocyt gevormd complex wordt gedetecteerd.

Een dergelijke detectie van het gevormde complex kan op volgens een van een veelheid van in het vak bekende werkwijzen worden uitgevoerd. Zo kan het agens fluorescent zijn

KONINKRIJK DER



10.02.00

PCT/NL 99 / 00806

NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



REC'D 23 FEB 2000

WIPO PCT

4

Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 19 februari 1999 onder nummer 1011341,
ten name van:

GLAXOWELLCOME B.V.

te Zeist

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Antigeen van een fagocyt, een fagocyt-herkennend agens, en een werkwijze voor het detecteren
van een gepreactiveerde fagocyt".

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 10 februari 2000.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

A.W. van der Kruk.

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

10 1 1 3 4 1

UITTREKSEL

B. v.d. I.E.

19 feb. 1999

De uitvinding heeft betrekking op een antigeen van
5 een fagocyt. Het antigeen volgens de uitvinding is specifiek
voor een gepreactiveerde fagocyt en kan worden herkend door
ten minste één bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd
uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en CBS 101482.
De uitvinding heeft tevens betrekking op een fagocyt-herken-
10 nend agens dat het voor een gepreactiveerde fagocyt specifieke
antigeen herkent, alsmede een farmaceutisch preparaat dat
een dergelijk agens bevat. Tenslotte heeft de uitvinding
betrekking op een werkwijze voor het detecteren van een
gepreactiveerde fagocyt onder gebruikmaking van een fagocyt-
15 herkendend agens volgens de uitvinding.

7^{II}

Antigeen van een fagocyt, een fagocyt-herkennend agens, en een werkwijze voor het detecteren van een gepreactiveerde fagocyt

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een antigeen van een fagocyt.

Chronische ontstekingsziekten, zoals bijvoorbeeld allergische astma en rheumatoïde arthritis, worden gemedieerd door ontstekingscellen zoals T-cellen en fagocyten. Op de plaats van een ontsteking in een orgaan worden cytokinen gevormd. Een deel van de cytokinen diffundeert naar het perifere bloed waar ze betrokken zijn bij de mobilisatie van nieuwe ontstekingscellen. Deze ontstekingscellen worden door interactie met een cytokine gepreactiveerd. De mate van preactivatie van fagocyten correleert met de hoeveelheid ontsteking bevorderende cytokinen en daarmee met de uitgebreidheid van de ontstekingsreactie. Met name voor ziekten gelocaliseerd in organen zoals de long en darm (bijvoorbeeld bij de ziekte van Crohn) is het fysiek zeer lastig of onmogelijk om zonder invasief onderzoek de ernst van een ontsteking betrouwbaar vast te stellen. Daarenboven geeft invasief onderzoek in de vorm van een biopt alleen informatie over de stand van zaken in het biopt zelf. Het betrouwbaar vaststellen van de ernst van een ontsteking is met name daarom lastig aangezien tot op heden geen voor een gepreactiveerde fagocyt specifiek antigeen is gevonden.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een antigeen van een fagocyt, waarbij het antigeen kan worden herkend door ten minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482.

Gevonden is dat het aldus gekarakteriseerde antigeen, dat aanwezig is op het oppervlak van een fagocyt, specifiek is voor een gepreactiveerde fagocyt. Door het vaststellen van de aanwezigheid van het antigeen en in het bijzonder de hoeveelheid daarvan kan de aanwezigheid van een ontsteking en de ernst daarvan worden vastgesteld. Ten minste ten dele gezuiverd antigeen, of fragmenten daarvan, kan wor-

den gebruikt voor het verkrijgen van gepreactiveerde fagocyt-herkennende agentia.

De uitvinding heeft tevens betrekking op een fagocyt-herkennend agens dat het antigeen herkent dat door ten
5 minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482 wordt herkend.

Een dergelijk agens, bijvoorbeeld een (monoclonaal) antilichaam, is zeer bruikbaar voor het vaststellen van de
10 aanwezigheid van een (orgaangebonden) onsteking en de ernst daarvan. Daarenboven kan het agens worden gebruikt voor het elimineren van gepreactiveerde fagocyten uit bloed, bijvoorbeeld door middel van aan een drager gebonden agens waarbij na contact tussen drager en bloed deze van elkaar worden ge-
15 scheiden.

In plaats daarvan kan ook worden gekozen voor het combineren van het agens met een groep die de fagocyt deactiveert of doodt. Hierbij kan worden gedacht aan een antilichaam voorzien van een celdodende eenheid, zoals een RicineB-
20 keten, of aan een bi-specifiek antilichaam dat het immuunsysteem ertoe aanzet de gepreactiveerde fagocyt te elimineren.

De uitvinding heeft derhalve verder betrekking op een farmaceutisch preparaat dat een fagocyt-herkennend agens
25 bevat tezamen met een farmaceutisch aanvaardbare vulstof of drager.

In het licht van de eerstgenoemde toepassing, het vaststellen van een ontsteking, heeft de uitvinding tevens betrekking op een werkwijze voor het detecteren van een
30 gepreactiveerde fagocyt, waarmee een gepreactiveerde fagocyt specifiek kan worden gedetecteerd.

Hiertoe wordt de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding gekenmerkt doordat een fagocyt-herkennend agens in contact wordt gebracht met een fagocyt, en een tussen het
35 fagocyt-herkennende agens en de fagocyt gevormd complex wordt gedetecteerd.

Een dergelijke detectie van het gevormde complex kan op volgens een van een veelheid van in het vak bekende werkwijzen worden uitgevoerd. Zo kan het agens fluorescent zijn

gelabeld en kan binding aan het oppervlak van de fagocyt met behulp van een fluorescentie microscoop of stromingscytometer (FACS) worden vastgesteld. Het label kan ook een enzym zijn, waarbij bijvoorbeeld het product van de door het enzym gekatalyseerde reactie wordt gedetecteerd. Daarbij kan als bepalingstechniek worden gedacht aan bijvoorbeeld een ELISA. Het gebruik van een enzym is met name interessant wanneer het agens een bacteriofaag is, aangezien de bacteriofaag kan zijn gerecombineerd om te coderen voor dit enzym. Het agens hoeft dan geen labeling te ondergaan.

Volgens een interessante uitvoeringsvorm is het agens in staat tot competitie met ten minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482, en een tussen het fagocyt-herkende agens en de fagocyt gevormd complex wordt gedetecteerd.

Door de beschikbaarheid van de uit de voornoemde stammen te isoleren bacteriofagen, wordt het thans mogelijk gericht verdere fagocyt-herkende agentia te zoeken aangezien de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding daar tevens een uitstekende test voor is. Dergelijke fagocyt-herkende agentia kunnen bijvoorbeeld peptiden zijn, daaronder begrepen peptidomimetica en peptiden met ongebruikelijke aminozuren, of organische verbindingen die met behulp van *combinatorial chemistry* kunnen worden bereid. Het gebruik van een dergelijk fagocyt-herkend agens, waartoe vanzelfsprekend ook de beide bacteriofagen worden gerekend zoals die uit de voornoemde stammen kunnen worden geïsoleerd, maakt het mogelijk van een fagocyt uit het bloed van een persoon of ander zoogdier vast te stellen of het een gepreactiveerde fagocyt is.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm is het agens een fluorescerend agens.

Aldus kan het gevormde complex gemakkelijk worden gedetecteerd, bijvoorbeeld met behulp van een fluorescentie microscoop.

Volgens een interessante uitvoeringsvorm omvat het agens in het zichtbaar licht fluorescerend eiwit dat daartoe hetzij geen prostetische groep benodigt, hetzij een prosteti-

sche groep vereist gekozen uit een in fysiologisch milieu aanwezig metaalion. Geschikt is het fluorescerende eiwit *Green of Blue Fluorescent Protein*.

Deze uitvoeringsvorm is met name dan interessant
 5 wanneer het agens een bacteriofaag is, aangezien de bacteriofaag kan zijn gerecombineerd om te coderen voor dit fluorescente eiwit. Het agens hoeft dan geen labeling te ondergaan met een fluorescente stof.

Met voordeel geschiedt het detecteren met behulp van
 10 een *Fluorescence-Activated Cell Sorter* (FACS).

Deze werkwijze maakt een snelle detectie en kwantificering van gepreactiveerde fagocyten mogelijk. Dit is bijvoorbeeld gunstig wanneer het belangrijk is dat snel inzicht wordt gekregen in de toestand van een patiënt, zoals bij
 15 sceptische shock, maar ook bij het nalopen van een scala op een fagocyt-herkennende eigenschappen te onderzoeken verbindingen, bijvoorbeeld zoals die hiervoor zijn genoemd.

Volgens een alternatieve uitvoeringsvorm geschiedt het detecteren met behulp van een ELISA. Daarbij kan gebruik
 20 worden gemaakt van een (met een enzym gelabeld) antilichaam tegen het fagocyt-herkennende agens. Wederom kan het agens een fusie-eiwit zijn (of bevatten) dat het enzym omvat.

Deze werkwijze heeft als voordeel dat het een eventuele gepreactiveerde fagocyt bevattende monster niet vers
 25 hoeft te zijn. Ook met deze werkwijze is het mogelijk een zeer groot aantal verbindingen op hun fagocyt-herkennende activiteit na te lopen.

De onderhavige uitvinding is in het bijzonder geschikt voor het detecteren van een gepreactiveerde fagocyt,
 30 waarbij die fagocyt afkomstig is van een persoon waarvan wordt gedacht dat die lijdt aan een aandoening gekozen uit de groep bestaande uit i) orgaangebonden onstekingsziekten, zoals inflammatoire longziekten (bijvoorbeeld allergische astma, COPD, en cysteuze fibrose) en darmziekten (bijvoorbeeld
 35 Colitis ulcerosa, en de ziekte van Crohn); ii) septische shock; iii) allergieën; en iv) auto-immuunziekten (bijvoorbeeld rheumatoïde arthritis); alsmede van traumapatiënt (bijvoorbeeld vroege detectie van ARDS); of een van persoon die een transplantatie heeft ondergaan (vroege detec-

tie van afstoting).

Aanvraagster sluit niet uit dat de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding gebruikt kan worden om van één of meer vormen *Repetitive Strain Injury* objectief vast te stellen en mogelijk te kwantificeren. In het laatste geval zou het effect kunnen worden gemeten van een behandeling, bijvoorbeeld met corticosteroiden of door fysiotherapie.

Met voordeel wordt voor de detectie bloed van een persoon gelyseerd met isotone, koude NH_4Cl -oplossing onder oplevering van een fagocytbevattende oplossing.

Aldus kan zeer snel een voor de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding geschikte fagocyt-bevattende oplossing worden bereid, waarin eventueel aanwezige gepreactiveerde fagocyten kunnen worden gedetecteerd.

De onderhavige uitvinding zal thans worden toegelicht aan de hand van het volgende uitvoeringsvoorbeeld, waarbij

Fig. 1 het specifiek geprimeerde neutrofiele granulocyte erkennende karakter van een agens volgens de uitvinding laat zien;

Fig. 2 laat zien dat dit onafhankelijk van de wijze van *primen* geschiedt;

Fig. 3 de dosis-afhankelijkheid van *primen* met GM-CSF laat zien; en

Fig. 4 laat zien dat het door een agens volgens de uitvinding herkende epitoom in verhoogde mate aanwezig is op eosinofiele granulocyten verkregen van een patiënt met symptomatisch allergische astma.

1) FAAGBIBLIOTHEEK MET ANTILICHAAMFRAGMENTEN OP HET OPPERVLAKE VAN DE FAGEN.

Door middel van de "phage display"-technologie kunnen eiwitten op de mantel van bacteriophagen tot expressie worden gebracht. In het onderhavige geval is een stukje DNA dat codeert voor een deel van een antilichaam-molecuul door middel van een recombinant DNA-technologie in hetzelfde leesraam gebracht als het DNA dat codeert voor bacteriofaag g3p-manteleiwit. Hierdoor ontstaat een g3p-omvattend fusie-eiwit. In een bibliotheek van dergelijke bacteriophagen bezitten de fagen elk een andere antilichaamsspecificiteit. Daartoe wordt

bij een groot aantal fagen het voor antilichaam coderende DNA uit B-lymfocyten gebruikt. Voor de onderhavige uitvinding is gebruik gemaakt van de "Phage-antibody library" beschreven door De Kruif et al. (ref. 1) en de Amerikaanse octrooiaanvraag met nr. 09/085.072 waarvan de beschrijving hierin door verwijzing is opgenomen.

In het kort werden gedegenereerde oligonucleotiden gebruikt om kunstmatige CDR3-gebieden met een lengte van 6 tot 15 nucleotiden toe te voegen aan een verzameling van 49 vooraf gekloneerde kiemlijn VH-genen. Vervolgens werden deze in vitro "geherrangschikte" VH-genen in een verzameling van pHEN1 van fagemid-afgeleide vectoren gekloneerd die zeven verschillende lichte keten V-gebieden bevatten, gefuseerd in een leesraam van het gen dat codeert voor het phage minor capsid proteïne-gen III. Het met behulp van een helperfaag (VCSM13, cat. no. 200251, Stratagene) bijvoorbeeld in *E. coli* XL-1 bacteriën (Stratagene) brengen van deze constructen leidt tot de expressie van single chain FV-antilichaamfragmenten als gen III fusie-eiwitten op het oppervlak van de bacteriofaag.

Er werd een phagemid bibliotheek verkregen van $1,2 \times 10^8$ klonen.

2) VERRIJKING VAN FAGEN VOOR GEPREACTIVEERDE FAGEN FAGOCYTEN SPECIFIEKE BACTERIOFAGEN EN CLONERING.

Ongeprimeerde leukocyten werden volgens een algemeen bekende techniek onder gebruikmaking van isotone lysis met behulp van een isotone, koude NH_4Cl oplossing geïsoleerd. Hierbij is het uitermate belangrijk contaminatie met lipopolysacharide (LPS) te vermijden door LPS-vrije media te gebruiken, aangezien LPS kunstmatig kan primen waardoor de werkwijze niet met succes kan worden uitgevoerd. Een deel (10^8) van de ongeprimeerde leukocyten-populatie werd in contact gebracht met de bacteriofaag bibliotheek (10^{11} bacteriofagen). Na 30 minuten werden de leukocyten afgedraaid (voorklaring) en niet verder gebruikt. In het supernatant blijven die bacteriofagen over die niet-geprimeerde leukocyten niet herkennen. Vervolgens werd een ander deel van de leukocytenpopulatie geprimeerd met granulocyt macrofaag-kolonie stimulerende factor GM-CSF (100 pM, 30 min., 37°C) en vervolgens in con-

tact gebracht met het hiervoor verkregen bacteriofagen-bevat-
tende supernatant. Nu binden de gezochte bacteriofagen aan de
leukocyten. De leukocyten werden gewassen en bacteriofagen
die aan de geprimeerde cellen bonden werden gevisualiseerd met
5 een tweestapskleuring. Eerst werden de cellen in contact
gebracht met een polyclonale antistof die de bacteriofagen
herkent (anti-M13). Vervolgens werd een met phyco-erythrine-
gelabelde antilichaam tegen het anti-M13 polyclonaal gebruikt
om de cellen die bacteriofagen hebben gebonden met behulp van
10 een FACS te visualiseren. De FACS was voorzien van een cel-
sorteerinrichting en die leucocyten werden geïsoleerd die
voldeden aan de volgende eis: Fluorescerende geprimeerde eosino-
fiele granulocyten (zie ref. 2). De bacteriofagen werden
van de gesorteerde geprimeerde eosinofiele granulocyten (een
15 subklasse van leukocyten) geëluëerd en zoals hiervoor be-
schreven vermeerderd. Deze werkwijze (voorklaring tot en met
elutie en vermeerderen) werd drie keer herhaald waardoor
steeds zuiverder bacteriofaag suspensies werden verkregen.
Vervolgens werden 200 bacteriofaag klonen vermeerderd en met
20 behulp van de volgende werkwijze en onder gebruikmaking van
de FACS beoordeeld.

SELECTIE VAN VOOR GEPREACTIVEERDE FAGOCYTEN-SPECI- FIEKE BACTERIOFAGEN

Ongeprimeerde leukocyten werden geïsoleerd als be-
25 schreven onder 2. Een tweede deel van de leukocyten werd be-
handeld met GM-CSF en fluorescent groen gelabeld met sulfi-
dofluoresceïne diacetaat (SFDA, voor labeling procedure zie
ref. 3). Hierna werden de geprimeerde fluorescent leukocyten
gemengd met ongekleurde ongeprimeerde cellen in een verhouding
30 1:1. Vervolgens werd deze gemengde celpopulatie in contact
gebracht met de verschillende bacteriofaag klonen. De klonen
van interesse moesten de volgende eigenschappen hebben: (i)
geen expressie op lymfocyten (rustend/geactiveerd), negatief
op rustende neutrofiele/eosinofiele granulocyten (herkenbaar
35 als niet groene granulocyten en de in ref. 2 voor eosinofiele
granulocyten genoemde gates), en positief op GM-CSF geprimeerde
granulocyten (herkenbaar als groene cellen in bovengenoemde
gates). Twee verschillende bacteriofaag klonen, zoals die
kunnen worden geïsoleerd uit de stammen A17 en A27 met aan-

winstnummers CBS 101481, respectievelijk 101482, vertoonden deze karakteristieken. Het deponeren van de stammen geschiedde op 1 december 1998 bij het CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Postbus 273, 3740 AG, Baarn).

5 Uit fig. 1 blijkt dat bacteriofaag A17 met GM-CSF geprimeerde neutrofiele granulocyten herkent, terwijl het niet-geprimeerde neutrofiele granulocyten niet herkent. | In het kort: Volbloed werd gepreincubeerd met buffer of met GM-CSF (10 pM) gedurende 15 min. bij 37°C. Hierna werden de rode bloedcellen
10 gelyseerd met ijskoude NH_4Cl -oplossing. Vervolgens werden de witte bloedcellen gewassen en gekleurd met de bacteriofaag A17 en geanalyseerd met een stromingscytometer. De neutrofiele granulocyten werden geïdentificeerd via hun unieke voorwaartse en zijwaartse lichtverstrooiingskarakteristieken. Het
15 getoonde experiment is representatief voor 25 verschillende experimenten.

Fig. 2 laat de relatieve fluorescentie-intensiteit zien van ongeprimeerde neutrofiele granulocyten en met GM-CSF (100 pM, 30 min., 37°C) of $\text{TNF}\alpha$ (100 IU/ml; 20 min.; 37°C)
20 geprimeerde neutrofiele granulocyten. Duidelijk blijkt dat met beide wijzen van primen resulteert in een grotere aanwezigheid van het door bacteriofaag A27 herkende epitoom. In het kort: Volbloed werd behandeld met GM-CSF (100 pM), $\text{TNF}\alpha$ (100 IU/ml), IL-5 (100 pM) of buffer gedurende 15 min. bij
25 37°C. Vervolgens werden de rode cellen gelyseerd (met ijskoude NH_4Cl oplossing), gewassen en gekleurd met A27(A) en A17(B). De waarden zijn weergegeven als gemiddelden \pm SE (n=24). Waarden aangegeven met * zijn significant verschillend van de buffercontrole ($p < 0.001$).

30 Fig. 3 geeft de dosis-afhankelijkheid voor de bacteriofaagstammen A17 en A27 van primen met GM-CFS weer. In het kort: Volbloed werd behandeld met verschillende concentraties GM-CSF of buffer gedurende 15 min. bij 37°C. Vervolgens werden de rode cellen gelyseerd (met ijskoude NH_4Cl oplossing), gewassen en gekleurd met A27(A) en A17(B). De waarden
35 zijn weergegeven als gemiddelden \pm SE (n=10).

Fig. 4 laat zien dat het door bacteriofaag A17 herkende epitoom in verhoogde mate aanwezig is op eosinofiele granulocyten verkregen van een patiënt met symptomatisch al-

5 lergisch astma. Dit experiment laat zien dat eosinofiele granulocyten in het bloed van symptomatisch astma patiënten een gepreactiveerd fenotype bezitten. De data van de patiëntcellen werden vergeleken met cellen uit het bloed (verkregen op dezelfde dag) van een normale donor voor en na behandeling in vitro met GM-CSF (100 pM). Het afgebeelde experiment is representatief voor ten minste 15 additionele experimenten.

Referenties

- Ref. 1 De "Phage antibody library" die is gebruikt is beschreven door De Kruif en collega's (Kruif et al., 1995. Selection and application of human scFv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with "designed" CDR3 regions, J.Mol. Biol., 248, 97 - 105).
- Ref. 2 Mengelers, H.J.J., Maikoe, T., Brinkman, L., Hooibrink, B., Lammers, J.W.J. en Koenderman, L. (1994). Immunophenotype of eosinophils recovered from blood and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatics. Am. J. Respir. Crit. Care med. 149: 345 - 351).
- Ref. 3 Mengelers, H.J.J., Maikoe, T., Brinkman, L., Hooibrink, B., Lammers, J.W.J. en Koenderman, L. (1995). Cognate interaction between human lymphocytes and eosinophils is mediated by beta2-integrins and very late antigen-4. J. Lab. Clin. Med. 126: 261 - 268).
- De beschrijving van deze referenties is hierin door verwijzing opgenomen.

CONCLUSIES

1. Antigeen van een fagocyt, met het kenmerk, dat het antigeen kan worden herkend door ten minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482.

5 2. Fagocyt-herkennend agens, met het kenmerk, dat het fagocyt-herkennende agens het antigeen herkent dat door ten minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482 wordt herkend.

10 3. Fagocyt-herkennend agens volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het een groep met een fagocyt deactiverende activiteit bezit.

15 4. Farmaceutisch preparaat dat een fagocyt-herkennend agens bevat tezamen met een farmaceutisch aanvaardbare vulstof of drager.

20 5. Werkwijze voor het detecteren van een gepreactiveerde fagocyt, met het kenmerk, dat een fagocyt-herkennend agens in contact wordt gebracht met een fagocyt, en een tussen het fagocyt-herkennende agens en de fagocyt gevormd complex wordt gedetecteerd.

25 6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat het agens in staat is tot competitie met ten minste een bacteriofaag zoals die kan worden geïsoleerd uit de stammen met aanwinstnummers CBS 101481 en 101482, en een tussen het fagocyt-herkennende agens en de fagocyt gevormd complex wordt gedetecteerd.

 7. Werkwijze volgens conclusie 6, met het kenmerk, dat het agens een bacteriofaag is.

30 8. Werkwijze volgens conclusie 6 of 7, met het kenmerk, dat het agens een fluorescerend agens is.

 9. Werkwijze volgens conclusie 8, met het kenmerk, dat het agens *Green of Blue Fluorescent Protein* omvat.

35 10. Werkwijze volgens conclusie 8 of 9, met het kenmerk, dat het detecteren geschiedt met behulp van een *Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)*.

 11. Werkwijze volgens één van de conclusies 5 tot 7,

met het kenmerk, dat het detecteren geschiedt met behulp van een ELISA.

12. Werkwijze volgens één van de conclusies 3 tot 11, met het kenmerk, dat de fagocyt afkomstig is van een
5 persoon waarvan wordt gedacht dat die lijdt aan een aandoening gekozen uit de groep bestaande uit i) orgaangebonden onstekingsziekten; ii) septische shock; iii) allergieën; en iv) auto-immuunziekten; of een van persoon die een transplantatie heeft ondergaan.

10 13. Werkwijze volgens conclusie 12, met het kenmerk, dat voor de detectie bloed van een persoon wordt gelyseerd met isotone, koude NH_4Cl -oplossing onder oplevering van een fagocytbevattende oplossing.

1011341

Aantal cellen

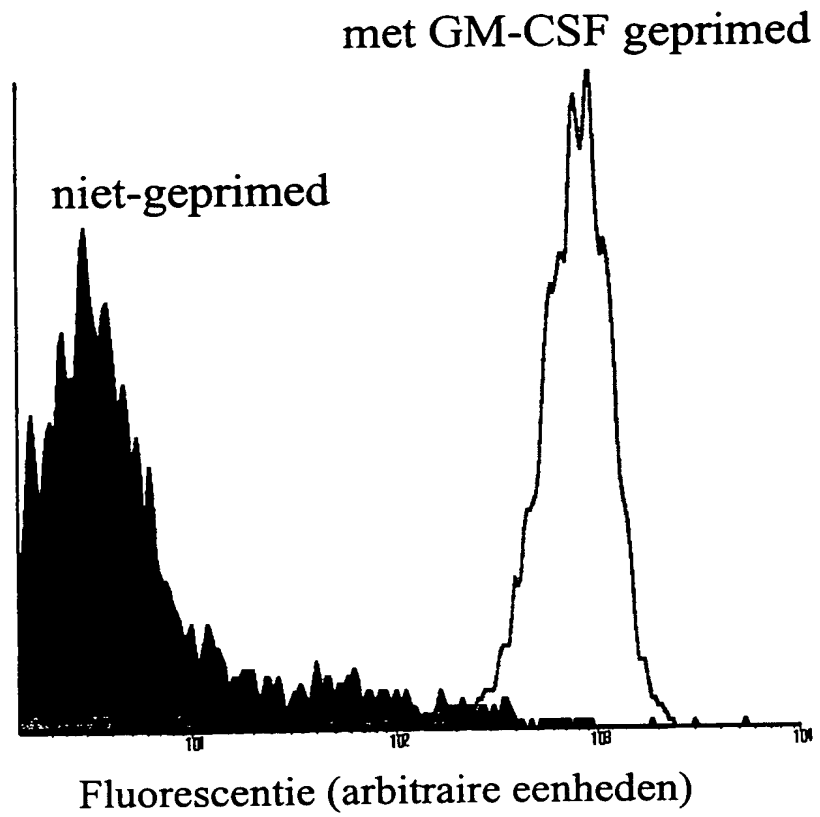


Fig. 1

1011341

10 1 13 4 1

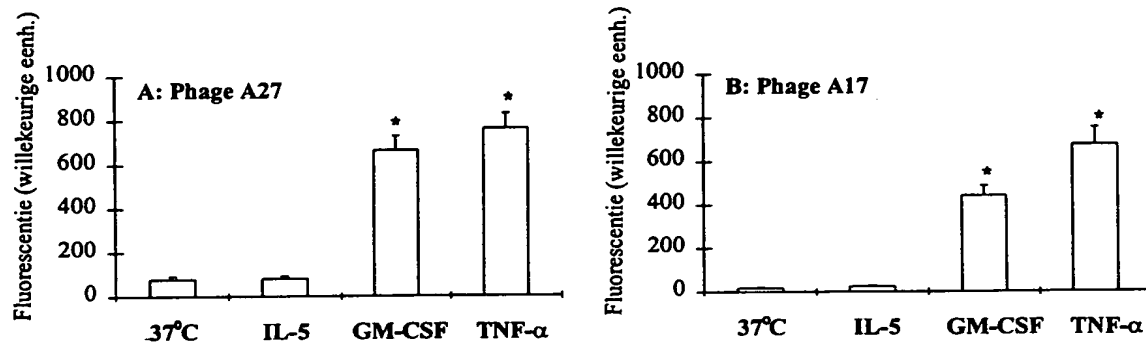


Fig. 2

10-13-4-1

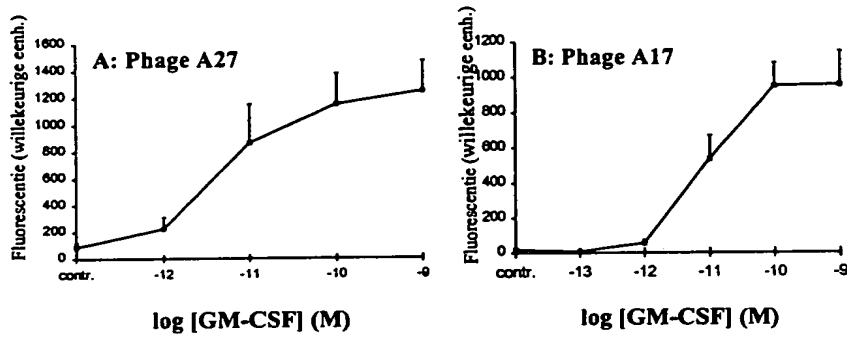


Fig. 3

10-11c

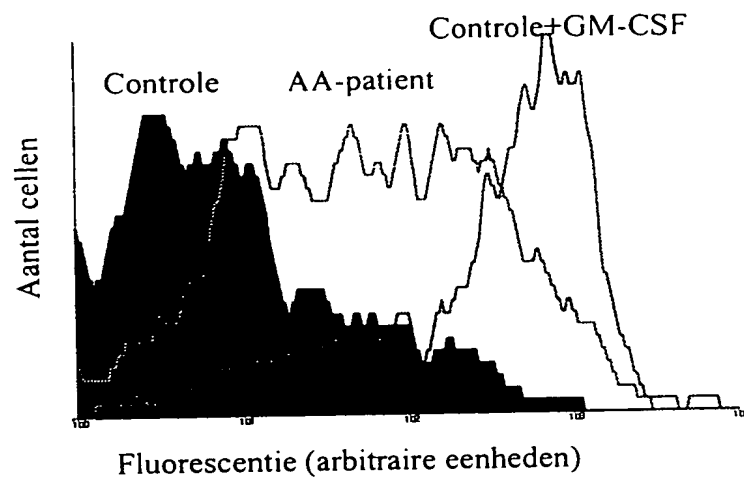


Fig. 4

1011341